

00361  
11  
21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**"DIAGNOSTICO MOLECULAR DE PORTADORAS  
DE LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE  
MEDIANTE LA AMPLIFICACION POR PCR  
DE SECUENCIAS INTRAGENICAS STR"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A

Biol. FRANCISCO  
JAVIER ESTRADA MENA

DIRECTORES DE TESIS : Dra. SILVIA CECILIA IRENE MONTAÑEZ OJEDA  
Dr. BULMARO CISNEROS VEGA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1997



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Vino a mirar y se ha quedado quiesto.  
No se mueve, no puede levantarse.  
Sobre su espalda tiene un ángel negro.  
Y se queda postrado días y días  
con su risa tostada y su silencio.  
Aunque quisiera, aunque llorara  
por correr, no puede. Su cuerpo  
ya enemigo lo detiene.  
¡Que sollozo callar y que lamento!  
Enraizado, sembrado como un árbol,  
con el tronco agitado y en el viento,  
le salen ojos por la piel,  
tiene otros cuerpos  
en el aire vecino, y se está quiesto.  
Un plomo oscuro en las piernas,  
un hongo de plomo le crece lento.  
Porque está atado, amarrado,  
tiene el corazón más suelto.*

**EL PARALÍTICO**  
*Jaime Sabines*

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO 4 DEL DEPARTAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL Y FUE DIRIGIDO POR EL Dr. BULMARO CISNEROS VEGA Y LA Dra. CECILIA MONTAÑEZ OJEDA.**

**EL PRESENTE TRABAJO FUE SUBVENCIONADO POR LA COMUNIDAD ECONOMICA EUROPEA, CONTRATO No. CH1-CT93-0098 Y POR EL DEPARTAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL CINVESTAV-IPN**

## **AGRADECIMIENTOS:**

**A mi hermano Benito por su impulso y ejemplo constante.**

**A Ceci y Bulmaro por su apoyo, crítica y el haberme permitido desarrollar este trabajo en uno de los laboratorios a su cargo.**

**A Diego Arenas por su asesoría desinteresada e incondicional.**

**A Adrian por el apoyo en los pisos altos.**

**A Ramón, Carmen, Flor y todos los compañeros del laboratorio por su amable ayuda**

**A Israel, Araceli, Roberto, Sergio, Joali y Jazmín por compartirme su amor familiar.**

**DEDICATORIA**

*A la incesante y palpitante  
vida que explota  
en sudorosos días  
sin retorno,  
en el hueso  
que se evapora  
por diagnosis lacerante.*

*Dejándonos solo,  
lo que ya teníamos  
desde el principio. . .*

**A mis padres Hortencia y Benito.**

# INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>10</b>
<b>1. Aislamiento de DNA genómico</b>	<b>10</b>
<b>2. Electroforesis de DNA</b>	<b>11</b>
<b>3. Amplificación de DNA mediante PCR</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Amplificación múltiple 9 y 5 plex de DNA DE LOS ENFERMOS DMD/DMB</b>	<b>12</b>
<b>3.2 Amplificación de los marcadores STR en familias afectadas con DMD/DMB y en la población no afectada</b>	<b>14</b>
<b>4. Obtención del control de secuenciación pBSMB</b>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>19</b>
<b>I. Frecuencia de heterocigocidad de los marcadores polimórficos STR 44, 45, 49 y 50 en la población mexicana</b>	<b>19</b>
<b>II. Identificación de deleciones en el gen DMD en pacientes mexicanos con DMD/</b>	



<b>DMB</b>	<b>29</b>
<b>III. Diagnóstico molecular de mujeres portadoras de la DMD/DMB</b>	<b>32</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>38</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>44</b>

## RESUMEN.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una miopatía que se hereda en forma recesiva ligada al cromosoma X. Debido a que las mujeres portadoras son generalmente asintomáticas, las pruebas clásicas no las detectan eficientemente. Para lograr este propósito, una primera aproximación consiste en la medición de los niveles séricos de la enzima creatinina fosfoquinasa, pero estos, son muy variables y se superponen entre portadoras y no portadoras.

Por otro lado, el diagnóstico molecular de la DMD, utilizando marcadores polimórficos ubicados dentro del gen, tiene una certeza del 100% en la mayoría de los casos. Sin embargo, para poder implementar su uso en el diagnóstico y el análisis de ligamiento en familias con antecedentes de DMD/DMB es necesario conocer los valores de heterocigocidad de los marcadores polimórficos en la población bajo estudio. En el presente trabajo se determinó la frecuencia de heterocigocidad en la población mexicana (44 cromosomas) de los marcadores polimórficos STR 44, 45, 49 y 50, ubicados en la región del punto caliente mayor para deleciones del gen DMD. Se encontró que para el locus STR 44 la heterocigocidad es 68.2%, para el locus STR 45 77.3%, para el locus STR 49 45.5% y para el locus STR 50 54.5%. También se determinó el tamaño de los alelos y se encontraron 46 tipos diferentes de estos.

El alto polimorfismo y heterocigocidad encontrados en nuestra población para los marcadores STR, permitió su utilización en la detección de portadoras de la DMD en dos familias mexicanas. Así mismo, el uso de los loci STR también hizo posible obtener información acerca del tamaño de la deleción encontrada en un paciente, que previamente se había analizado mediante la amplificación múltiple diseñada por Chamberlain *et al*, (1989) y Beggs *et al*, (1990). Utilizando marcadores STR ubicados en los extremos del gen DMD, se descartó un posible evento de recombinación que podría haber alterado los resultados de detección de portadoras en las familias analizadas.

## **INTRODUCCION.**

**Las distrofias musculares son enfermedades genéticamente de terminadas, en ellas se presenta debilidad muscular progresiva y una degeneración muscular característica que se evidencia tanto eléctrica, bioquímica como histológicamente. En estas enfermedades hay más de un síndrome clínico, representado por un error innato del metabolismo, con expresión clínica en varios sistemas de órganos además del musculo. Las distrofias musculares se clasifican de acuerdo a la forma de herencia, la edad de inicio, los grupos de musculos involucrados y la tasa de progresión. Los tipos más importantes de distrofia muscular son: la distrofia muscular de Duchenne Becker (DMD/DMB), la distrofia de cintura (LG), la distrofia oculofaríngeal y la distrofia miotónica (MyD) (Appel *et al*, 1983).**

**Por lo que respecta a la distrofia muscular de Duchenne, esta fue descrita en 1860 por el fisiólogo francés G. Duchenne de Boulogne y es la enfermedad genética neuromuscular con el mayor índice de mortalidad, afectando a 1 de cada 3500 varones (Schwartz, 1992). Los pacientes con DMD tienen debilidad muscular entre los 2 a 5 años, perdiendo la capacidad para caminar y a partir de los 11 años deben permanecer en silla de ruedas. La muerte por insuficiencia cardíaca o respiratoria sobreviene generalmente antes de los 20 años, a menos que el enfermo reciba asistencia respiratoria. Un hallazgo interesante es el nivel elevado en el suero de la enzima creatinina fosfocinasa (CPK) aún antes de los síntomas y en etapas clínicas tempranas. La CPK está también elevada (aunque en menor grado) en el suero de las dos terceras partes de las mujeres portadoras de la enfermedad, proporcionando un útil aunque no definitivo examen para la detección de portadoras (Engel, 1986).**

La distrofia muscular de Becker DMB es semejante a DMD, hasta hace poco tiempo se consideraba una enfermedad diferente debido a su inicio posterior, un curso más benigno, y por lo tanto una sobrevivencia más larga. Ahora se sabe que pacientes de ambas distrofias (DMB y DMD) contienen mutaciones en el mismo gen, designado DMD (Worton y Thompson, 1988).

Tanto la DMD como la DMB están clasificadas como desordenes hereditarios recesivos ligados al cromosoma X, de aquí la importancia de la determinación de portadoras, sin embargo 30% de todos los casos se deben a mutaciones *de novo* en familias sin previa historia de desordenes neuromusculares (Schwartz *et al*, 1992). El gen DMD fue localizado y aislado, utilizando tecnicas de Genética Molecular (Monaco y Kunkel, 1989). El gen clonado se usó para identificar el producto proteico correspondiente, llamado distrofina (Hoffman *et al*, 1987).

El gen de la distrofina es el de mayor longitud dentro de los conocidos a la fecha, contiene aproximadamente 2.5 millones de nucleótidos, con 79 exones separados por largos intrones y ocupa el 1% del cromosoma X humano (Burghes *et al*, 1987, Gutmann y Fischbeck, 1989, Koenig *et al*, 1987 y Roberts *et al*, 1993). Las 14 kilobases del RNA mensajero codifican 3688 aminoácidos que resultan en una proteína con un peso molecular de 427 kilodaltones (KD). La distrofina presenta un gran parecido con proteínas del citoesqueleto con funciones estructurales (Ahn y Kunkel, 1993). Esta proteína se produce en todos los tipos celulares musculares y en ciertas neuronas (Hoffman *et al*, 1988). Estudios recientes se han enfocado en la expresión del gen DMD y han mostrado un elaborado

control y procesamiento transcripcional. Al menos seis promotores independientes pueden especificar la transcripción de la distrofina, dependiendo del tipo celular. Tres promotores expresan la proteína completa y dos promotores cercanos a la región 3' terminal, expresan los últimos dominios de forma mutuamente excluyente. Se ha reportado una nueva proteína denominada Dp140 y el promotor del cual se expresa, se ubica posiblemente en el intron 44 del gen DMD (Lidov *et al*, 1995).

La distrofina, está formada por los siguientes cuatro dominios: i) Dominio amino, el cual está constituido por 240 aminoácidos y es parecido en secuencia y función a la alfa-actinina, una proteína de unión a los filamentos de actina (Hammond, 1987, Lindenbaum y Carbonetto, 1993 y Mimura y Asano, 1986). ii) El segundo dominio está constituido por 2700 aminoácidos conformados en 24 repetidos homólogos, dispuestos en forma de triples alfa hélices y con 109 aminoácidos en promedio por cada repetido. Este dominio presenta semejanza con la espectrina; componente del citoesqueleto de los eritrocitos que probablemente constituya hileras largas y flexibles (Ahn y Kunkel, 1993 y Koenig *et al*, 1988). iii) El tercer dominio está constituido por 150 aminoácidos, rico en cisteína y es similar al tercer dominio de la alfa-actinina de *Dictyostelium discoideum*. iv) El cuarto dominio, ubicado en la región carboxilo terminal tiene 420 aminoácidos y presenta homología con la utrofina; proteína producida por un gen localizado en el cromosoma humano 6q24. Este dominio carboxilo terminal interactúa con varias proteínas transmembranales con las que forma los complejos sarcoglicano y distroglicano (Ahn y Kunkel, 1993, Blake *et al*, 1994, Kunkel y Hoffman, 1989, Lindenbaum y Carbonetto, 1993 y Worton y Thompson, 1988).

Aún no se conoce con detalle el papel funcional de la distrofina y su diversidad estructural, sin embargo, estudios genéticos, bioquímicos y anatómicos de esta proteína sugieren que proporciona estabilidad membranal durante la contracción muscular, transducción de fuerza contráctil al medio extracelular y organización de especializaciones de la membrana en tejidos no contráctiles, manteniendo las concentraciones de los componentes de la membrana y/u organizando la topología de ésta (Ahn y Kunkel, 1993, Hoffman *et al*, 1989 y Kunkel y Hoffman, 1989).

Los intrones largos, particularmente dentro de la región amino terminal y de la región de repetidos, explican al menos en parte, la alta tasa de mutaciones observadas en la población. Alrededor del 60 al 70% de los pacientes tienen deleciones parciales en el locus DMD (Den Dunnen *et al*, 1989, Kunkel y Hoffman, 1989, Lederfein *et al*, 1992 y Love *et al*, 1989). La mayoría de las deleciones se inician en un gran intron, entre los exones 44 y 45 (Den Dunnen *et al*, 1989, Oudet *et al*, 1991, Arenas, 1996 y Coral, 1995). Las deleciones encontradas en esta región se extienden únicamente en dirección 3', con un tamaño aproximado en la mayoría de las deleciones de 200 Kb. Las dos terceras partes de las eliminaciones encontradas en enfermos con DMD se localizan en esta región denominada "punto caliente mayor" (exones 44-53). Existe otra región en donde se localizan un número considerable de deleciones, denominada "punto caliente menor" (exones 1-11) (Den Dunnen *et al*, 1989, Koenig *et al*, 1988, Roberts *et al*, 1993). En el punto caliente menor, las deleciones se extienden en dirección 5' y 3' y su tamaño es heterogeneo, las mutaciones asociadas con la DMB se localizan principalmente en este punto. En esta región se han encontrado aproximadamente el 70% de las duplicaciones de los enfermos de DMD/DMB

(Hu *et al*, 1988).

Basándose en el estudio de la distribución de las eliminaciones en los enfermos DMD/DMB analizados, se ha propuesto un mapa patológico-funcional de la distrofina: deleciones en el dominio amino terminal ocasionan un fenotipo variable pero grave de DMB; deleciones en el segundo dominio ocasionan un fenotipo muy leve o atípico; deleciones en el tercer dominio provocan una DMB típica; deleciones en el dominio carboxilo terminal, con algunas excepciones, resultan en DMD (Ahn y Kunkel, 1993, Beggs y Kunkel, 1990, Gangopadhyay *et al*, 1992, Koenig *et al*, 1989 y Passos-Bueno *et al*, 1994).

No obstante de que las mayores esperanzas para erradicar la DMD están puestas en la terapeutica, actualmente no existe ningún tratamiento que pueda disminuir el ritmo inexorable de progreso de esta enfermedad. De aquí la importancia del diagnóstico prenatal, la detección de portadoras y el consejo genético. Como se indicó anteriormente un método tradicional de diagnóstico es la medición de niveles de la enzima creatinin fosfocinasa CPK. Sin embargo, estos niveles pueden variar en un mismo sujeto en mediciones diferentes, además de que la distribución de los niveles de la enzima se traslapan entre mujeres normales y portadoras, dando resultados ambiguos (Hodgson y Bobrow, 1989). Con la clonación completa del gen asociado con la DMD/DMB (Koenig *et al*, 1987), y la identificación de la distrofina, varias tecnicas moleculares y bioquímicas se han desarrollado para mejorar el diagnóstico de pacientes DMD/DMB, para el diagnóstico prenatal, así como métodos para una detección más exacta de portadoras (Hoffman y Schwartz, 1991). Utilizando sondas de DNA genómico y de DNA complementario (cDNA) es posible realizar

hibridaciones que permiten la detección del 55% de las mutaciones de la DMD, aunque esta metodología es larga y relativamente cara (Koenig *et al*, 1987, Arenas, 1996 y Coral, 1995). Las sondas genómicas compuestas en su mayoría por secuencias no codificadoras (intrones), también pueden detectar fragmentos de restricción largos y polimórficos (RFLP's) dentro o alrededor del gen DMD y utilizarse en estudios de ligamiento para dar asesoramiento genético. Los problemas que presenta el uso de esta metodología para el diagnóstico molecular son el gran tamaño y la alta frecuencia de recombinación intragénica reportada para el gen DMD (Abbs *et al*, 1991) y que el análisis de los RFLP's no detecta el defecto en el gen. Se ha desarrollado el método alternativo (multiplex 9 y 5) para la detección de las deleciones en el gen DMD, que logra la amplificación por PCR de 14 exones del gen DMD situados en los puntos "calientes" mayor y menor, (Chamberlain *et al*, 1988 y Beggs *et al*, 1990).

Por otra parte, se han identificado en los cromosomas a las secuencias variables repetidas sucesivas denominadas VNTR's (Weissenbach, 1993). Estas secuencias se heredan de forma mendeliana, son altamente polimórficas (es decir, variables de un individuo a otro e incluso entre los dos alelos de un mismo individuo), están ampliamente distribuidas y pueden detectarse por PCR, por estas características, son de gran utilidad tanto en el diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias, como en estudios para la identificación de individuos (Weissenbach *et al*, 1992). Se ha estimado que existen de 50 000 a 100 000 copias de estas secuencias en el genoma humano, las llamadas (dC-dA)<sub>n</sub>-(dG-dT)<sub>n</sub>, también denominadas (CA)<sub>n</sub>. Estas secuencias de dos nucleótidos, que se repiten muchas veces, pertenecen a la subclase de secuencias cortas sucesivas, denominadas marcadores o loci



**STR's.** Se han reportado marcadores STR de CA en el gen DMD, uno en la región 3', otro en el intrón 63, cuatro en la región 5' y uno en cada uno de los intrones 44, 45, 49 y 50 y se han utilizado exitosamente en el diagnóstico de portadoras de la DMD/DMB (Beggs y Kunkel, 1990, Clemens *et al*, 1991, Feener *et al*, 1991, Oudet *et al*, 1990 y Powell *et al*, 1991).

Utilizando las secuencias cortas (CA)<sub>n</sub> polimórficas o marcadores STR localizados en los intrones 44, 45, 49 y 50 del gen DMD (STR 44, STR 45, STR 49 Y STR 50 respectivamente) el grupo de Clemens, determinó la distribución y frecuencia de heterocigocidad en una población caucásica (50 cromosomas) sin relación de parentesco y no afectada con la DMD/DMB, con el fin de poder establecer su utilidad en el diagnóstico de portadoras de esta enfermedad. Este grupo, encontró una frecuencia de heterocigocidad para STR 44 de 87%, para STR 45 de 88.7%, para STR 49 de 93.3% y para STR 50 de 71.6% (Clemens *et al*, 1991). Así mismo, empleó estas secuencias de repetidos CA para identificar deleciones en mujeres portadoras. Una de las ventajas de los marcadores STR, es que se pueden detectar eficientemente por medio de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Clemens *et al*, 1991).

## **OBJETIVOS.**

**I. Determinación de las frecuencias de heterocigocidad para los marcadores STR 44, STR 45, STR 49 y STR 50 en la población mexicana.**

**II. Diagnóstico molecular de portadoras de la DMD/DMB en familias mexicanas, mediante la amplificación por PCR de los marcadores STR del gen DMD.**

**III. Identificación de deleciones en enfermos mexicanos de DMD/DMB, utilizando la amplificación múltiple 9 y 5 plex.**

## **MATERIALES Y METODOS.**

### **1. AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO HUMANO.**

El DNA genómico humano se extrajo a partir de leucocitos provenientes de individuos no emparentado, pertenecientes a la población mexicana, con padres y abuelos nacidos en México y sin antecedentes de DMD/DMB, así como de personas pertenecientes a familias con DMD/DMB. El DNA se obtuvo básicamente siguiendo el método descrito por Kempter, 1992, con la diferencia de que al final se purificó con extracciones fenólicas. A 15 ml de sangre, se les agregó 1 ml de anticoagulante (EDTA al 5% a pH 7.6) y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. Los linfocitos se separaron de la interfase con una pipeta Pasteur. Las células se resuspendieron vigorosamente y se lavaron de 3-4 veces en amortiguador ALCR (Tris 10 mM pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y NaCl 10 mM), posteriormente se centrifugó la muestra a 3000 rpm durante 10 min. Se obtuvo una pastilla celular la cual se resuspendió en 1.772 ul de NaCl 5 mM y se le agregaron 92 ul de SDS al 10% con el fin de lisar las células. Se agitó fuertemente el tubo conteniendo la mezcla y se adicionaron 616 ul de NaCl saturado, agitando nuevamente durante 5 min. Las muestras se sometieron a centrifugación a 15 000 rpm durante 30 min, para remover las proteínas precipitadas en la solución. Se decantó el sobrenadante en tubos nuevos y se sometió a extracciones fenólicas (Maniatis *et al*, 1989). El DNA presente en la fase acuosa se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto, se separó de esta solución, se secó y se disolvió en un volumen de 250-800 ul de agua estéril. El DNA se calentó a 65°C durante 10 min para disolverlo y cuantificarlo en geles de agarosa mediante la comparación con un patrón de concentración conocida de DNA del fago lambda digerido con HindIII (GIBCO-BRL) y/o midiendo su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro.

## **2.ELECTROFORESIS DE DNA.**

La electroforesis se efectuó en geles horizontales de agarosa que contenían 0.5 ug/ml de bromuro de etidio. El amortiguador utilizado fue TBE 1X (Tris-base 89 mM y EDTA 2 mM) (Maniatis *et al*, 1989). El voltaje utilizado fue de 100 volts, tanto en los minigeles como en los geles medianos de 11.5 cm X 13.5 cm.

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó de acuerdo a lo descrito por Maniatis *et al*, 1989. Los geles fueron preparados a partir de una solución stock de acrilamida al 30 o al 40% y con una relación de acrilamida/bisacrilamida de 30:1. Se agregaron las cantidades necesarias de amortiguador TBE 10X (Tris-base 108 gr, ácido bórico 54 gr y 40 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 por litro), persulfato de amonio al 10%, TEMED y urea como desnaturalizante a una concentración final del 6%. El amortiguador de corrida fue TBE 1X y los colorantes indicadores fueron azul de bromofenol y xilen cianol, ambos al 0.1% y formamida al 98%. Los geles se secaron de 30 a 60 min y se expusieron a una placa autorradiográfica de 12 a 48 hrs, a -70 °C. Posteriormente se revelaron y analizaron las placas de acuerdo al patrón de bandeó.

## **3. AMPLIFICACION DE DNA MEDIANTE PCR.**

El DNA de los individuos enfermos de DMD/DMB, de las mujeres pertenecientes a familias con antecedentes de DMD/DMB y de las personas no afectadas y sin antecedentes de esta enfermedad, se amplificó por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) , usando pares de oligonucleótidos localizados dentro del gen DMD (Saiki, 1990).

### 3.1. AMPLIFICACION MULTIPLE 9 Y 5 PLEX DE DNA DE LOS ENFERMOS DMD/DMB.

La detección de deleciones en los enfermos de DMD/DMB se efectuó utilizando series de 9 y 5 pares de oligonucleótidos, denominados 9 y 5 plex (Chamberlain *et al*, 1988, Beggs *et al*, 1990). Estos pares de oligonucleótidos identifican diferentes exones del gen DMD ubicados en los puntos "caliente mayor" y "caliente menor". Las características de los oligonucleótidos y su secuencia se presentan en la tabla A. Las reacciones de amplificación se realizaron en tubos que contenían 2.5 U de Taq polimerasa (Perkin Elmer Cetus o GIBCO-BRL), amortiguador para la enzima (MgCl<sub>2</sub> 6.7 mM, Sulfato de amonio 16.6 mM Tris-HCl 67 mM pH 8.8, 170 ug/ml de Albúmina de suero bovino, B-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 6.7 mM), 100-200 ng de DNA, 12.5 pmoles de cada oligonucleótido, 1.5 mM de cada dNTP, 10% de DMSO, agua desionizada esteril hasta completar 25 ul y 25 ul de aceite mineral. Las reacciones se incubaron en un termociclador Perkin-Elmer Cetus 480 de acuerdo a las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C, 7 min; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C, 30 seg; alineamiento a 52°C, 30 seg; polimerización a 65°C, 4 min y una extensión final de 7min a 65°C. Los DNAs que se analizaron con los 5 plex se alinearon a una temperatura de 54°C durante 30 seg. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 4% conteniendo 0.5 ug/ml de bromuro de etidio.

EXON	SECUENCIA	FRAGMENTO (pb)
<b>9 PLEX</b>		
Exón 4	5'-TTGTCGGTCTCTCTGCTGGTCAGTC 3'-CAAAGCCCTCACTCAAACATGAAGC	196
Exón 8	5'-GTCTTTACACACACTTTACCTGTTGAG 3'-GGCTCATTTCTCATGTTCTAATTAG	360
Exón 12	5'-GATAGTGGGCTTTACTTACATCCTTC 3'-GAAAGCAAGCAACATAAGATACAACCT	331
Exón 17	5'-GACTTTGGATGTTGAGATTACTTTTCC 3'-AAGCTTGAGATGCTCTCACTTTTCC	416
Exón 19	5'-TTCTACCACATCCCATTTTCTTCCA 3'-GATGGCAAAAAGTGTGAGAAAAAGTC	459
Exón 44	5'-CTTGATCCATATGCTTTTACCTGCA 3'-TCCATCACCCCTCAGAACTGATCT	268
Exón 45	5'-AAACATGGAACATCCTTGTGGGGAC 3'-CATTCTATTAGATCTGTGGCCCTAC	547
Exón 48	5'-TTGAATACATTGGTTAAATCCCAACATG 3'-CCTGAATAAAGTCTTCTTACCACAC	506
Exón 51	5'-GAAAATTGGCTCTTTAGCTTGTGTTTC 3'-GGAGAGTAAAGTGATTGGTGGAAAATC	388
<b>5 PLEX</b>		
Promotor	5'-GAAGATCTAGACAGTGGATACATAACAAATGCATG 3'-TTCTCGAAGGTAATTGCTCCAGATCTGAGTCC	535
Exón 13	5'-AATAGGAGTACCTGAGATGTAGCAGAAAT 3'-CTGAOCTTAAGTTGTTCTTCCAAAGCAG	238
Exón 43	5'-GAACATGTCAAAGTCACTGGCACTTCATGG 3'-ATATATGTGTTAOCCTTACOCCTTGTGGTCC	357
Exón 50	No publicada	711
Exón 52	5'-AATGCAGGATTTGGAACAGAGGGCTCC 3'-TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTC	113

**TABLA A.** Ubicación y secuencia de los oligonucleótidos de 5 y 9 plex, así como el tamaño del fragmento amplificado.

### **3.2. AMPLIFICACION DE LOS MARCADORES STR EN FAMILIAS AFECTADAS CON DMD/DMB Y EN POBLACION NO AFECTADA.**

La amplificación por PCR de los repetidos variables de (CA)<sub>n</sub> o marcadores STR se efectuó en población no afectada por la DMD/DMB, con la finalidad de determinar la heterocigocidad de estos marcadores y poder utilizarlos en la detección de portadoras. Así mismo se amplificaron las secuencias polimórficas STR de familias afectadas con la DMD/DMB con la finalidad de determinar el estado portador de las mujeres pertenecientes a estas familias.

En la tabla B se muestran la localización y secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar a los marcadores STR centrales (44 a 50) y de los extremos 5' y 3'. La amplificación de los marcadores STR de los intrones 44, 45, 49 y 50 se efectuó siguiendo los pasos que describe Clemens *et al*, 1991. Cada reacción de PCR se llevó a un volumen final de 15 ul con agua desionizada esteril e incluyó 20 ng de DNA; 1.5 ul de amortiguador de reacción 10X (Tris-HCl 100mM pH 8.3, KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM); los dNTPs 200 mM; dCIP<sup>32</sup> 20mM ( 2 uCi ); 2.5 pmoles del par de oligonucleótidos STR 50 y 15 pmoles de cada par de oligonucleótidos STR 44, 45 o 49; 1 unidad de Taq polimerasa y 25 ul de aceite mineral. Los oligonucleótidos para los marcadores STR 44 y STR 49 se colocaron en una misma reacción de PCR y los oligonucleótidos para los marcadores STR 45 y STR 50 también se colocaron juntos en una reacción. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C, 5 min; 23 ciclos de desnaturalización a 94°C, 30 seg; alineamiento a 62°C, 30 seg; polimerización a 65°C, 2 min y extensión final de 5 min a 65°C.

Para la amplificación efectuada con los oligonucleótidos DYSII-5' (Feener *et al*, 1991) la reacción se realizó en 50 ul de volumen final conteniendo 400 ng de DNA, 5 ul de

amortiguador 10X, 16 pmoles de cada oligonucleótido, 2.5 U de Taq polimerasa y 50 ul de aceite mineral. En esta reacción se utilizaron los mismos componentes y a la misma concentración que en las amplificaciones de los marcadores STR 44, 45, 49 y 50. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C, 5 min; 24 ciclos de desnaturalización a 94°C, 30 seg; alineamiento a 55°C, 30 seg; polimerización a 63°C, 4 min y una extensión final de 10 min a 63°C.

En cuanto a las reacciones de PCR con los oligonucleótidos DMD1c-2 que amplifican secuencias STR del extremo 3' (Powel *et al*, 1991), éstas se efectuaron en 30 ul de volumen final de reacción que contenía 300 ng de DNA, 3 ul de amortiguador 10X, 10 pmoles de cada oligonucleótido, 1 U de Taq polimerasa y 30 ul de aceite mineral. Los demás constituyentes de la reacción y sus concentraciones fueron señalados anteriormente en la amplificación de los repetidos STR centrales. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C, 6 min; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C, 2 min; alineamiento a 50°C, 2 min; polimerización a 72°C, 1 min y una extensión final de 5 min a 65°C. Alicuotas de 5-10 ul de todas las reacciones de PCR se mezclaron con 5-10 ul de amortiguador de muestra desnaturalizante (formamida 98%, xilen cianol 0.1%, azul de bromofenol 0.1% y EDTA 10mM pH 8) se incubaron a 95°C por 5 min y se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6%, se secaron y se expusieron a placas autorradiográficas.



Ubicación de los Oligonucleótidos	SECUENCIA	NOMBRE	Referencias
Intrón 44	TCCAACATTGGAAATCACATTTCAA TCATCACAAAATAGATGTTTCACAG	STR 44/A STR 44/B	Chernara <i>et al.</i> 1991
Intrón 45	GAGGCTATAATTCTTTAACTTTGGC CTCTTCCCTCTTTATTCATGTTAC	STR 45/A STR 45/B	Chernara <i>et al.</i> 1991
Intrón 49	CGTTTACCAGCTCAAAAICTCAAC CATATGATACGATTGCTGTTTTGC	STR 49/A STR 49/B	Chernara <i>et al.</i> 1991
Intrón 50	AAGGTTCCCTCCAGTAACAGATTGG TATGCTACATAGTATGTCTCAGAC	STR 50/A STR 50/B	Chernara <i>et al.</i> 1991
200 Kpb del extremo 5' del promotor de músculo	TCTTGATATATAGGGATTATTGTGTTTGTTATAC ATTATGAAACTATAAGGAATAAATCATTTAGC	DYS II-5' DYS II-3'	Foote <i>et al.</i> 1991
Intrón 60	TGTCGTCTTCAGTTATATG ATAACTTACCAAGTCATGT	DMD 1c-2-5' DMD 1c-2-3'	Fossell <i>et al.</i> 1991

**TABLA B.** Ubicación y secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de los marcadores STR del gen DMD.

#### 4. OBTENCION DEL CONTROL DE SECUENCIACION pBSMB.

La región amplificada del plásmido pBSMB que se utilizó para conocer los tamaños de los alelos STR de las personas no afectadas con la DMD/DMB, es un fragmento de 908 pb constituido por un inserto de 734 pb del gen de la enzima Taq DNA polimerasa, flanqueado por las secuencias iniciadoras de M13 (*lacZ*). La metodología utilizada para amplificar el control de secuenciación pBSMB, fue la indicada en el "Kit" de secuenciación AmpliCycle™ PERKIN ELMER. El primer paso consistió en marcar radioactivamente al iniciador, agregando a un tubo de reacción 0.6 ul de amortiguador de cinasa 10X, 0.5 ul de iniciador 20 uM, 1.0 ul de [gama-<sup>32</sup>P]-ATP equivalente a 10uCi, 3 ul de T4 polinucleótido cinasa (10 U/ul) y 1.1 ul de agua desionizada esterilizada para completar un volumen final de 6.2 ul. La reacción se incubó a 37°C durante 10 min y después a 90°C durante 5 min en el termociclador. Una vez marcado radioactivamente el iniciador se procedió a secuenciar el control de secuenciación pBSMB, colocando en 4 tubos, 4 ul de cada una de las mezclas de terminación para A, T, C y G. En otro tubo se preparó la mezcla de reacción agregando 1 ul de iniciador marcado radioactivamente, 4 ul de amortiguador de mezcla de reacción 10X (Tris-HCl 500mM pH 8.9, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM y Tween<sup>R</sup> 20 a 0.25%), 5 ul del control de secuenciación pBSMB, 1 ul de Taq polimerasa (1 U) y 9 ul de agua desionizada esteril para completar un volumen final de 20 ul. A cada uno de los 4 tubos conteniendo las mezclas de terminación, se le agregaron 4 ul de la mezcla de reacción, agitando suavemente y 8 ul de aceite mineral. Las condiciones de amplificación para estas reacciones fueron: 1 ciclo a 95°C durante 1 min; 20 ciclos de 1 min a 68°C y de 1 min a 68°C. Una vez concluida la amplificación, a cada tubo se le agregaron 4 ul de solución de paro (Formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0.05% y xilen cianol al

0.02%), los tubos se agitaron en vortex y se tomaron alícuotas de 5-10 µl, las cuales se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida desnaturalizantes (tal como se describió en la sección 3.2), flanqueando al DNA amplificado de los marcadores STR.

## RESULTADOS.

### I. Frecuencia de Heterocigidad de los marcadores polimórficos STR 44, 45, 49 y 50 en la población mexicana.

La heterocigidad de los marcadores genéticos empleados en el diagnóstico molecular de la DMD/DMB es una información que se requiere conocer para realizar el análisis de ligamiento genético en las familias que presentan antecedentes de DMD/DMB. Los marcadores serán informativos, en este tipo de análisis, en función de su heterocigidad. Con la finalidad de conocer la heterocigidad, tamaño y frecuencia de los marcadores STR 44, 45, 49 y 50 en la población mexicana, ubicados dentro del gen que codifica para la Distrofina, se analizaron 22 personas no afectadas por DMD/DMB y sin relación de parentesco. Las muestras de DNA se extrajeron de linfocitos de sangre periférica de acuerdo al procedimiento señalado en material y métodos. Las condiciones de amplificación del DNA por PCR fueron las reportadas por Clemens *et al* 1991 y están descritas en la sección de materiales y métodos.

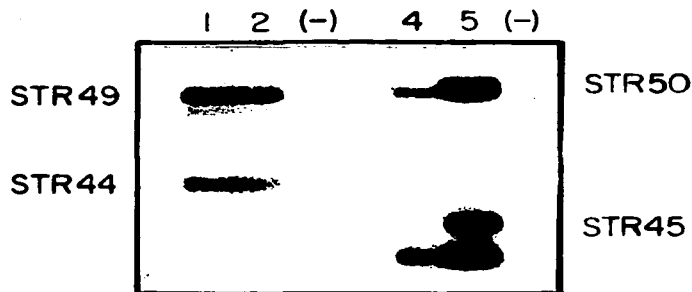
Después de probar que el DNA de un varón (24) y una mujer (26) generaron 1 y 2 bandas respectivamente (ver fig. 1), se procedió a amplificar las muestras de 22 individuos.

Tomando en cuenta la ventaja de que al analizar DNA extraído de mujeres se obtienen resultados de 2 cromosomas X en vez de 1 cromosoma X cuando se trabaja con hombres, se decidió utilizar prioritariamente DNA de mujeres. En la segunda amplificación se trabajó con el DNA de 4 mujeres identificadas con los números 11, 15, 26 y 28. Los resultados obtenidos muestran que para los marcadores STR 44 y 45, todas las muestras resultaron heterocigotas; se obtuvieron 2 bandas en la amplificación de esta secuencia. Por lo que respecta al marcador STR 49, se obtuvo una banda para la muestra 15, lo que indica que

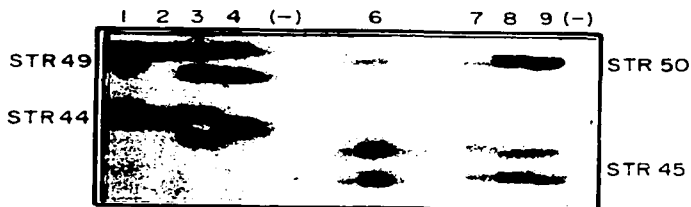
la persona es homocigota, mientras que se obtuvieron 2 bandas para las muestras 11, 26 y 28. Para STR 50, solo el No. 26 es heterocigota y el resto de las muestras; 11, 15 y 28 resultaron ser homocigotas (fig. 2).

En el siguiente ensayo PCR, se amplificó el DNA extraído de las mujeres 3, 9, 12, y 18 (fig. 3). Los resultados muestran que las numeros 3 y 9 son mujeres homocigotas y 12 y 18 heterocigotas para la región del marcador STR 44. Para STR 49, la muestra 18 resultó ser heterocigota y las 3, 9 y 12, homocigotas. En cuanto a la región STR 45, las mujeres 3, 12 y 18 muestran heterociguidad. La muestra 9, presentó una banda inespecífica (región inferior derecha), por lo que, se decidió repetir nuevamente su amplificación. Para el marcador STR 50, las mujeres 3 y 9, son homocigotas y las 12 y 18 son heterocigotas.

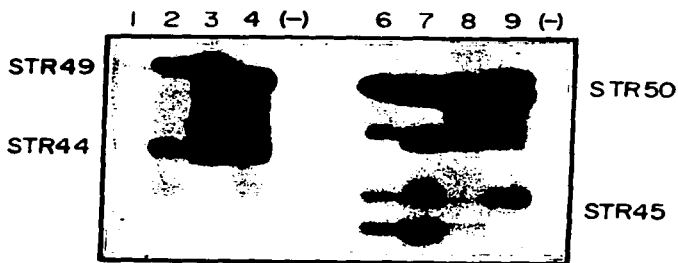
La fig.4 muestra los productos de amplificación de los DNAs de las mujeres: 9 (trabajado parcialmente en el ensayo anterior, ver fig. 3), 20, 34 y 35. En este experimento se decidió incluir en el corrimiento del gel, la secuencia del plásmido pBSMB, (ver Materiales y Métodos), que sirvió para determinar los tamaños de los alelos (CA)<sub>n</sub> encontrados en los loci STR 44, 45, 49 y 50. Las muestras se corrieron en un gel de acrilamida para secuenciación, con la finalidad de obtener una mejor separación de las bandas (ver fig. 4). Como se puede observar, la mujer 9 resultó homocigota para STR 44, mientras que las mujeres 20, 34 y 35 son heterocigotas. En cuanto al marcador STR 49, la mujer 34 resultó heterocigota y las mujeres 9, 20 y 35, homocigotas. Por último, para el locus STR 50, las muestras 9 y 34 son homocigotas y las 20 y 35 son heterocigotas. Cabe señalar que, en este ensayo PCR no se logró una buena coincidencia entre la intensidad de las bandas de los loci STR y la de las bandas del control de secuenciación pBSMB, sin embargo, se logró determinar los tamaños de los marcadores STR, usando dos placas de diferente exposición.



**Fig. 1 Amplificación de los marcadores STR 44, 49, 45 y 50 de las muestras 24 y 26. Los DNAs se obtuvieron a partir de muestras sanguíneas de las personas en estudio y se sometieron a PCR de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los productos de PCR se analizaron en geles de acrilamida al 6% y se expusieron a placas autorradiográficas. En los carriles 1, 2 y 4 se presenta la migración del DNA de un varón (No. de identificación 24). Los marcadores STR están señalados a los lados del cuadro. En el carril 5 está la migración del DNA de una mujer (No. de identificación 26). En los carriles (-) se observa el mismo ensayo de PCR pero sin DNA (controles negativos).**

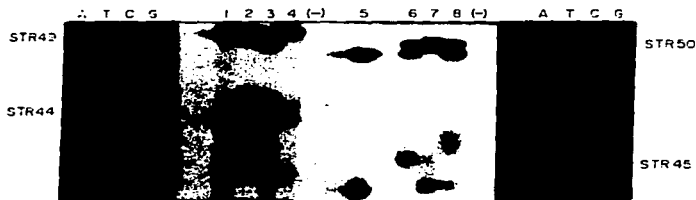


**Fig. 2 Amplificación de los marcadores STR 44, 49, 45 y 50, de las muestras 11, 15, 26 y 28.** Los DNAs se obtuvieron a partir de linfocitos de las personas en estudio (ver Material y Métodos). Las muestras de DNA se sometieron a PCR como se describe en Material y Métodos y los productos de PCR se corrieron en geles de acilamida al 6% y se expusieron a placas autorradiográficas. La ubicación de los loci STR se señalan a los lados del cuadro. Carril 1, muestra 11; carril 2, muestra 15; carril 3, muestra 26; y carril 4, muestra 28. El análisis de los loci STR 44 y 49 está en los carriles 1 al 4 y de los marcadores STR 45 y 50 se presenta en los carriles 6 a 9. Carril 6, muestra 11; carril 7, muestra 15; carril 8, muestra 26; y carril 8, muestra 28. En los carriles 5 y 10 se efectuó la reacción de PCR pero sin DNA (controles negativos).



**Fig. 3** Análisis de los loci STR 44, 45, 49 y 50 de las muestras 3, 9, 12 y 18. Se extrajo el DNA de muestras sanguíneas de las personas estudiadas, como se describe en Material y Métodos. El DNA se sometió a la reacción de PCR; los productos resultantes se analizaron en gels de acrilamida al 6% y se expusieron a placas autoradiográficas (ver Material y Métodos). La ubicación de los marcadores STR, se indica a los lados del cuadro. Al carril 1 y 6 corresponde el DNA de la muestra 3, al 2 y 7 de la 9, al 3 y 8 de la 12 y al 4 y 9 de la 18. En los carriles 5 y 10 se realizaron los ensayos PCR completos pero sin DNA (controles negativos).

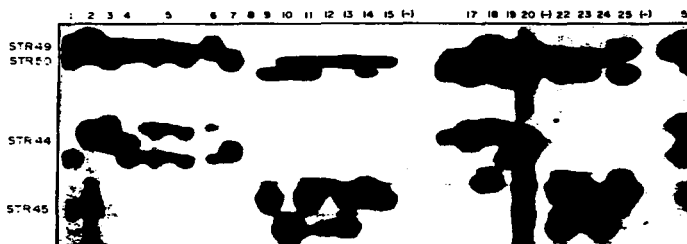




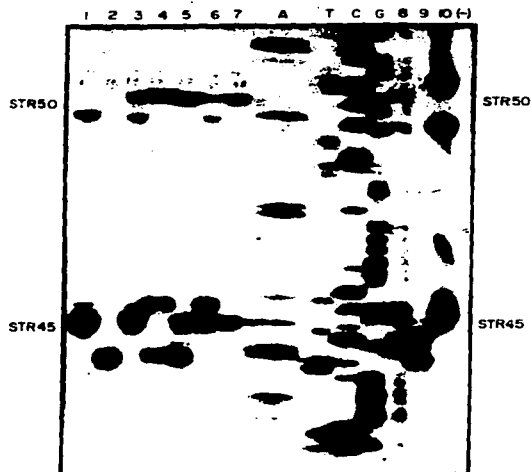
**Fig. 4** Amplificación de los loci STR 44, 45, 49 y 50 de las mujeres 9, 20, 34 y 35. Los DNAs se extrajeron de muestras de sangre de las personas estudiadas, siguiendo los pasos descritos en Material y Métodos. Muestras de estos DNAs se sometieron a PCR, se corrieron en geles de acrilamida y se expusieron a placas autoradiográficas, como se describe en Material y Métodos. En los carriles laterales migró el control de secuenciación pBSMB en el orden A T C G. La ubicación de los marcadores STR se presenta a los lados del cuadro. Las bandas de los loci STR 44 y STR 49 se corrieron en los carriles 1 al 4; carril 1, muestra 9; carril 2, muestra 20; carril 3, muestra 34; y carril 4, muestra 35. Las bandas de los loci STR 45 y STR 50 se corrieron en los carriles 5 al 8; carril 5, muestra 9; carril 6, muestra 20; carril 7, muestra 34; y carril 8, muestra 35. A los carriles (-) corresponden los controles negativos (toda la reacción de amplificación, sin DNA).

En los dos siguientes experimentos de amplificación por PCR, se trabajaron los DNAs de 11 mujeres, identificadas con los numeros: 13, 16, 19, 25, 27, 32, 48, 6, 17, 29 y 36. Los productos de las amplificaciones, se corrieron en un gel de secuenciación. Para el locus STR 44 resultaron heterocigotas las muestras: 19, 25, 27, 32, 17 y 29 y homocigotas las mujeres: 13, 16, 48, 6 y 36. Para el locus STR 49 se encontró que son heterocigotas las mujeres: 19, 27, 6, 17 y 29 y homocigotas las muestras: 13, 16, 25, 32, 48 y 36. En cuanto al locus STR 45 se encontró que son heterocigotas las muestras: 19, 25, 27, 32, 6, 17, 29 y 36 y homocigotas los numeros 13, 16 y 48. Por último con el locus STR 50, se encontró que son heterocigotas las mujeres: 16, 19, 32, 6, 17, 29 y 36 y homocigotas: 13, 25, 27 y 48 (ver fig.5).

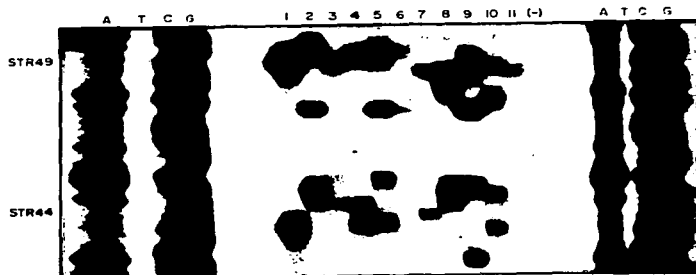
En los siguientes experimentos se amplificó el DNA de las mujeres identificadas con los numeros: 13, 16, 19, 25, 27, 32, 48, 6, 17, 29 y 36 con el objeto de determinar el tamaño de sus alelos (CA)<sub>n</sub> ubicados en los loci STR. Por lo cual se realizó el experimento de amplificación junto con el control de secuenciación pBSMB. En este experimento, cuyos resultados se aprecian en la fig. 6, fue posible determinar los tamaños de los alelos (CA)<sub>n</sub>, excepto para los alelos del locus STR 44, los cuales no aparecieron en ningún carril. Posteriormente se comprobó que el problema con el análisis del marcador STR 44 fué la concentración baja de los oligonucleótidos iniciadores. Los resultados de los tamaños de los alelos STR 44 y 49 se presentan en la fig. 7, en la cual se aprecian las 2 regiones correspondientes a los loci STR 44 y 49 y se observa el corrimiento de los fragmentos del plásmido pBSMB flanqueando a los marcadores STR.



**Fig. 5** Amplificación de los loci STR 44, 45, 49 y 50 de las mujeres 13, 16, 19, 25, 27, 32, 48, 6, 17, 29 y 36. A partir de muestras sanguíneas de las personas en estudio, se obtuvieron los DNAs cuyas alícuotas se sometieron a PCR. (ver Materiales y Métodos). Los productos de PCR se analizaron en geles de acrilamida al 6%. La ubicación de los marcadores STR se muestra del lado izquierdo del cuadro. Del carril 1 al 7, y del 9 al 15, se corrieron los DNAs de las mujeres: 13, 16, 19, 25, 27, 32 y 48 (colocados en ese orden en los carriles señalados). Del carril 17 al 20, y del 22 al 25, se corrieron los DNAs de las mujeres: 6, 17, 29 y 36 (colocados en ese orden en los carriles señalados). En los carriles (-) se corrieron los controles negativos (con todo excepto DNA).



**Fig. 6** Identificación de las alenas (CA)<sub>n</sub> de los loci STR 45 y 50, presentes en la población mexicana. Los DNAs se obtuvieron a partir de muestras sanguíneas de las personas en estudio y alícuotas de estas fueron sometidas a PCR de acuerdo a como se describe en *Materiales y Métodos*. Los productos de PCR se analizaron en gels de secuenciación al 6% y se expusieron a placas autorradiográficas. El control de secuenciación está señalado en los carriles A T C G. Carril 1, muestra 13; carril 2, muestra 16; carril 3, muestra 19; carril 4, muestra 23; carril 5, muestra 27; carril 6, muestra 32; carril 7, muestra 48; carril 8, muestra 17; carril 9, muestra 29; y carril 10, muestra 36 (en la región inferior están señaladas las bandas correspondientes a STR 45 y en la superior a STR 50). en el carril (-) está el control negativo (con todos los reactivos excepto DNA).



**Fig. 7** Amplificación de los loci STR 44 y STR 49 de las mujeres: 13, 16, 19, 25, 27, 32, 48, 6, 17, 29 y 36. Los DNAs se obtuvieron a partir de muestras sanguíneas de las personas en estudio y alícuotas de estas fueron sometidas a PCR de acuerdo a como se describe en Materiales y Métodos. Los productos de PCR se analizaron en gels de acrilamida al 6% y se expusieron a placas autorradiográficas. El control de secuenciación pBBMB se corrió en los carriles señalados como A T C G. En la región central inferior se aprecia el análisis del locus STR 44 y en la región central superior, el locus STR 49. Carril 1, muestra 13; carril 2, muestra 16; carril 3, muestra 19; carril 4, muestra 25; carril 5, muestra 27; carril 6, muestra 32; carril 7, muestra 48; carril 8, muestra 6; carril 9, muestra 17; carril 10, muestra 29; y carril 11, muestra 36. En el carril 12 se corrió el control negativo.

En las tablas I y II se muestran los resultados obtenidos en todas las reacciones de amplificación. En la tabla I se muestran los tamaños de los alelos encontrados al analizar los loci STR 44, 45, 49 y 50 en 30 cromosomas. Así mismo, se muestra la frecuencia de los alelos encontrados. En la tabla II, se muestran las medidas de variación, presentadas como porcentajes de heterocigocidad, determinados a partir de 44 cromosomas. Como se observa en la tabla II, el locus con mayor porcentaje de heterocigocidad es el STR 45 (73.3%), seguido por STR 44 (68.2%), STR 50 (54.5%) y STR 49 (45.5%). En los loci STR 44 y STR 45 se encontraron 13 tipos diferentes de alelos, en STR 49, 12 y en STR 50, 8 tipos.

## **II. Identificación de deleciones en el gen DMD en pacientes mexicanos con DMD/DMB.**

En el análisis molecular de pacientes con DMD/DMB es importante la detección de eliminaciones, ya que este tipo de mutaciones se han reportado como las más frecuentes en esta enfermedad, presentándose en alrededor del 65% de los pacientes (Worton y Thompson, 1988). Mediante la amplificación múltiple del DNA por PCR se pueden localizar de manera rápida y precisa el 98% de las alteraciones mayores presentes en el gen DMD (Beggs *et al*, 1990).

Con la finalidad de detectar posibles eliminaciones en el gen DMD, los DNAs de cuatro pacientes mexicanos con DMD/DMB fueron analizadas por amplificación múltiple con los 9 y 5 plex, como se describe en Material y Métodos. Cabe señalar, que con la amplificación 9 y 5 plex, se detectan eliminaciones en las zonas propensas a mutaciones mayores (Chamberlain *et al*, 1988 y Beggs *et al*, 1990).

Alelo (tamaño)	Frecuencia %	Alelo (tamaño)	Frecuencia %
<b>STR 44:</b>		<b>STR 49:</b>	
A (177)	3.3	A (231)	3.3
B (187)	3.3	B (235)	3.3
C (188)	3.3	C (240)	6.7
D (189)	6.7	D (241)	3.3
E (191)	16.7	E (245)	6.7
F (193)	3.3	F (247)	6.7
G (194)	3.3	G (250)	6.7
H (197)	3.3	H (251)	3.3
I (198)	10	I (252)	6.7
J (200)	6.7	J (253)	3.3
K (201)	3.3	K (254)	3.3
L (202)	3.3	L (255)	16.7
M (204)	13.3		
<b>STR 45:</b>		<b>STR 50c:</b>	
A (156)	3.3	A (235)	20
B (157)	3.3	B (236)	13.3
C (158)	13.3	C (237)	3.3
D (159)	10	D (242)	3.3
E (163)	3.3	E (243)	16.7
F (167)	3.3	F (244)	13.3
G (170)	16.7	G (246)	6.7
H (171)	10	H (251)	3.3
I (173)	6.7		
J (174)	3.3		
K (175)	3.3		
L (177)	6.7		
M (182)	3.3		

**Tabla I.** Tamaños y frecuencias de los alelos STR 44, 45, 49 y 50 presentes en población mexicana. Los números en los parentesis indican los tamaños en pares de bases (pb), determinados por comparación con la secuencia del control de secuenciación pBSMB. La frecuencia se determinó al dividir el número de veces que se encontró cada alelo entre el número total de alelos identificados.

Locus (numero de cromosomas analizados)	Heterocigidad %	No. de alelos diferentes observados
STR-44 (44)	68.2	13
STR-45 (44)	77.3	13
STR-49 (44)	45.5	12
STR-50 (44)	54.5	8

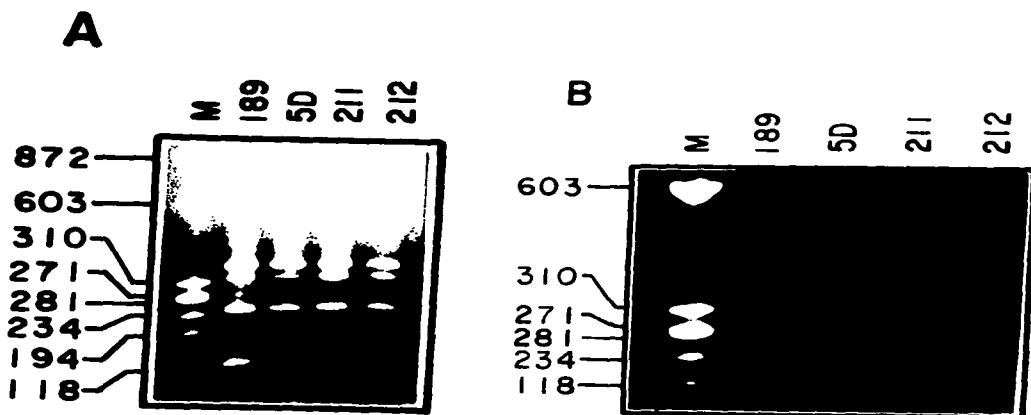
Tabla II. Frecuencia de heterocigidad y No. de alelos observados (CA)s, en los loci STR del gen de la Distrofina.



Los cuatro niños, identificados como: 189, 5D, 211 y 212 (los dos últimos son hermanos), presentaron altos niveles de la enzima CPK (datos no mostrados). En la fig. 8, se muestran los resultados encontrados al amplificar los DNAs de estos niños con la amplificación múltiple de DMD 5 y 9. Como se puede observar, al niño identificado como 5D, se les detectaron deleciones en los exones: 50, 52 (5 Plex) y 51 (9 Plex), mientras que a los tres niños restantes no se les detectaron deleciones en estos exones. La extensión de las mutaciones en el niño 5D se abordó en los siguientes experimentos que corresponden al análisis de ligamiento (ver fig. 9).

### **III. Diagnóstico Molecular de mujeres portadoras de la DMD/DMB.**

Tomando en cuenta la frecuencia de heterocigocidad de los marcadores STR encontrada en la población mexicana se decidió efectuar el diagnóstico de mujeres portadoras, a través del análisis de ligamiento y utilizando las secuencias STR (repetidos de (CA)<sub>n</sub>). Se analizaron dos familias identificadas como: D y 26, con las secuencias polimórficas presentes en los intrones centrales STR 44, STR 49 y STR 50 (Clemens *et al*, 1991). La familia 26 se analizó también con un marcador localizado en el extremo 3' (DMD1c-2) (Powell *et al*, 1991), y con otro situado cerca del extremo 5' (DYS II-5') (Feener *et al*, 1991) esto con la finalidad de descartar eventos de recombinación.



**Fig. 8** Detección de deleciones en pacientes con DMD/DMB. (A) Amplificación de DNA utilizando el 9 plex. (B) Amplificación de DNA utilizando el 5 plex. M: marcador, DNA de  $\alpha$ X174 cortado con HaeIII.

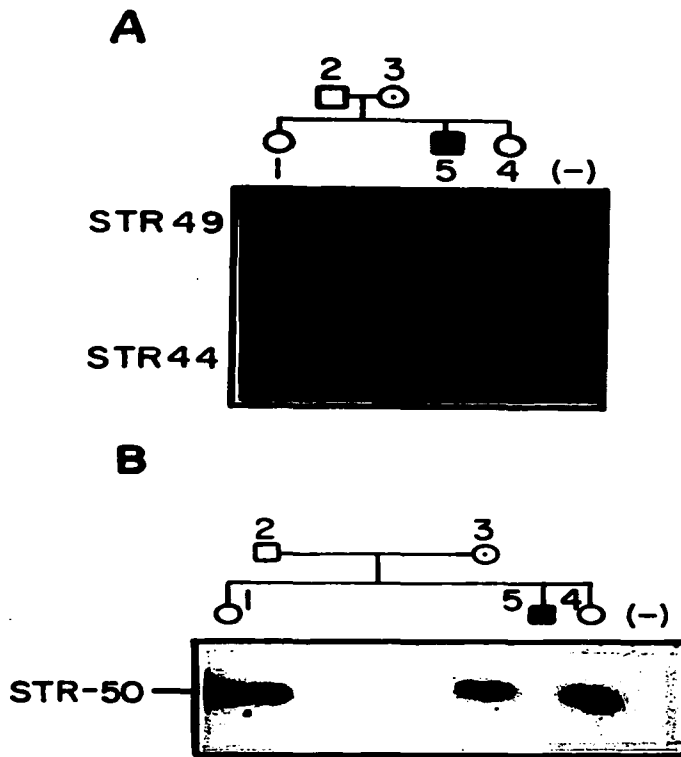
En la familia D, se había encontrado mediante el análisis multiplex de PCR que el niño 5D, afectado con DMD, tenía una deleción de los exones 50, 51 y 52. Esto fué confirmado con la amplificación de las regiones STR 49 y STR 50, en las cuales no se obtuvieron fragmentos, indicando que la deleción incluye a los intrones 49 y 50 (ver fig. 9). En esta familia, la mujer 3D (madre del niño afectado 5D) es portadora obligada, lo que se demuestra al observarse uno solo de los alelos; el alelo faltante correspondería al que porta la deleción. Las mujeres 1D y 4D (hermanas del niño 5D), heredaron el alelo materno que no porta la deleción, lo que demostró que no son portadoras de la enfermedad.

En la Fig. 10 se muestran el pedigree y las autorradiografías obtenidas de la amplificación de los alelos (CA)<sub>n</sub> de los loci STR 44, 49, DYS II-5' y DMD1c-2-3', de la familia 26. En esta familia se encuentra un varón afectado con DMD, identificado con el número 26.1. Cabe señalar que este paciente presenta deleción en los exones 46 y 47 (Coral, R.M., 1995). Los resultados obtenidos para el locus STR 49, muestran que las hermanas del paciente 26.1, no son portadoras de la DMD, ya que heredaron el alelo que no segrega con la enfermedad (el alelo que segrega con la enfermedad está presente en el paciente 26.1) (ver fig. 10 panel A y A').

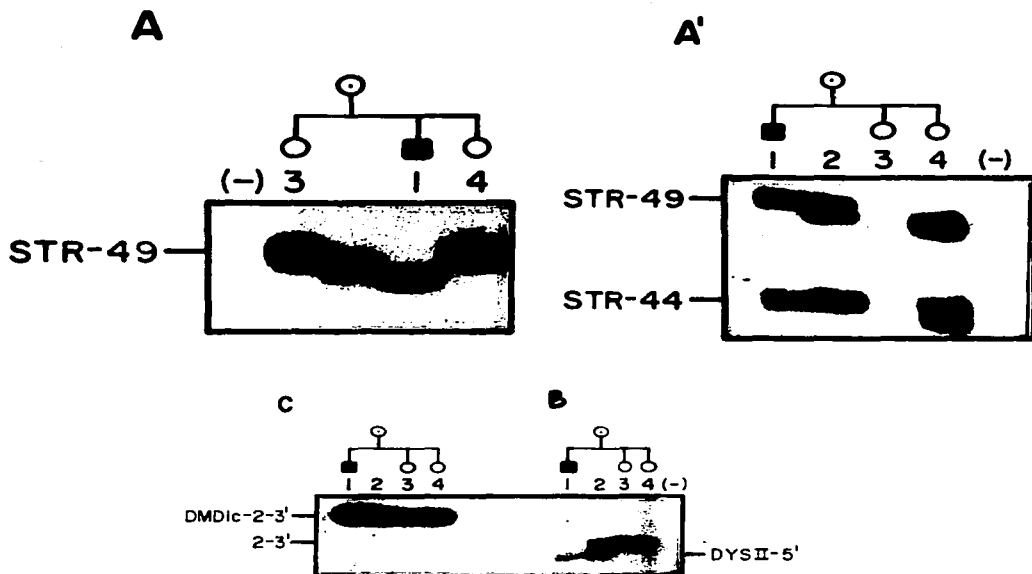
En cuanto al locus STR 44, la amplificación muestra que esta región no es informativa, debido a que la madre que es portadora obligada (número 26.2) es homocigota para este marcador, lo que impide la identificación del alelo que va ligado a la enfermedad (fig. 10 panel A').

Por lo que respecta a la no portación de la mutación responsable de la DMD en las

hermanas del varón afectado, en el locus STR 49, cabía la posibilidad de que este resultado se debiera a un evento de recombinación meiótica que alterara el ligamiento de los alelos con la enfermedad. Para descartar esta posibilidad de recombinación, se efectuó la amplificación y análisis de los alelos de la región polimórfica DYS II-5' (ubicada hacia el extremo 5' del gen DMD) y se encontró que las hermanas (26.3 y 26.4) no heredaron el alelo ligado con la enfermedad, confirmando el resultado previo (ver fig. 10 panel B). Así mismo se realizó el análisis y amplificación de los alelos de la región ubicada hacia el extremo 3' (marcador DMD1c-2-3'), los cuales no fueron informativos ya que, produjeron un solo fragmento (fig. 10 panel C), lo que indica que la mujer portadora obligada es homocigota para este marcador.



**Fig. 9** Pedigree de la familia D. El DNA genómico fué aislado y analizado como se describe en Materiales y Métodos. (A) En la autorradiografía se muestran los alelos (CA)<sub>n</sub> para los loci STR 49 (parte superior) y STR 44 (parte inferior). (B) En la autorradiografía se observan los alelos (CA)<sub>n</sub> para el locus STR 50. (-) Control negativo.



**Fig. 10 Pedigree y autorradiografías de la familia 26.** El DNA de los miembros de la familia fué aislado de linfocitos y amplificado como se describe en Materiales y Métodos. (A) Autorradiografía de los alelos (CA)<sub>n</sub> presentes en el locus STR 49. (A') Autorradiografía de los alelos (CA)<sub>n</sub> presentes en los loci STR 44 y STR 49. (B) Autorradiografía que muestra la amplificación de los alelos (CA)<sub>n</sub> en el locus DYS II-5. (C) Autorradiografía de los alelos (CA)<sub>n</sub> en el locus DMD 1c-2-3'. (-) Control negativo.

## DISCUSION.

Las mujeres portadoras de la DMD/DMB son asintomáticas en su gran mayoría debido a que solo tienen mutado uno de sus dos genes que codifican para la distrofina. El gen normal que presentan produce distrofina suficiente para que el músculo tenga un funcionamiento normal. En base a lo anterior, la identificación de mujeres portadoras para la DMD/DMB es difícil de llevar a cabo.

La determinación del estado portador de la enfermedad generalmente se lleva a cabo mediante la medición de los niveles de la enzima muscular creatinina fosfoquinasa (CPK) en suero, los cuales son altos en la mayoría de las mujeres portadoras. Sin embargo, aunque estos datos aportan cierta información, estos son imprecisos debido al hecho de que en una misma mujer, fluctúan los niveles de la CPK en función de diversos factores (Appel y Roses, 1983, Barkhaus y Gilchrist, 1989, Schwartz *et al*, 1992 y Worton y Thompson, 1988).

Apartir de la clonación del gen DMD (Koenig *et al*, 1987, Worton y Thompson, 1988), se han identificado secuencias polimórficas fuera y dentro del gen, lo que ha permitido la detección de portadoras por medio de pruebas de ligamiento genético (Darras *et al*, 1988). Para la determinación del estado portador de la DMD/DMB en mujeres en riesgo, en este estudio se emplearon secuencias polimórficas intragénicas denominadas STR, las cuales se localizan en los intrones 44, 45, 49 y 50 y en los extremos 5' y 3' del gen DMD (Clemens *et al*, 1991, Feener *et al*, 1991 y Powel *et al*, 1991).

Las ventajas que presenta la utilización de los marcadores STR son:

- Los marcadores STR 44, 45, 49 y 50 se localizan dentro de la región del gen en la que se ha encontrado la mayor frecuencia de mutaciones (Clemens *et al*, 1991), por lo cual, la

amplificación de estos loci permite la detección de deleciones en pacientes con DMD/DMB y en mujeres portadoras. Cuando se identifica una deleción en una mujer en riesgo, el diagnóstico tiene una certeza del 100%.

- La alta heterocigocidad encontrada en estos loci en nuestra población (discutida más adelante) y en otras poblaciones estudiadas (Beggs y Kunkel, 1990, Clemens *et al*, 1991, Feener *et al*, 1991 y Powell *et al*, 1991). Esta característica les permite a estos marcadores ser altamente informativos.
- Con la utilización de los 4 marcadores STR ubicados en la región central del gen de la distrofina y los otros 2, situados uno en cada extremo del gen se disminuye el riesgo de un error en el diagnóstico causado por la alta recombinación meiótica que ocurre en la región que abarca los intrones 44 y 50 del gen DMD (Oudet *et al*, 1992). Se considera que con la utilización de 2 secuencias en el punto caliente mayor de eliminación del gen DMD y los 2 marcadores de los extremos, es posible obtener información diagnóstica de portadoras y de eventos de recombinación intragénica, en casi todas las familias DMD/DMB que se analizan (Chakraborty *et al*, 1994).
- El diagnóstico temprano y certero de las portadoras que se obtiene con estos marcadores es útil para el consejo genético.
- Con estos marcadores, se puede diagnosticar casos aislados (sin antecedentes familiares de DMD/DMB), si se detecta la deleción.
- Una ventaja adicional, es que con el empleo de estos marcadores se puede realizar análisis de paternidad.

Por lo que respecta a la determinación de la frecuencia de heterocigocidad en la



población mexicana, de las 23 mujeres no afectadas por la DMD/DMB y sin relación de parentesco, analizadas en los cuatro loci (CA)<sub>n</sub> del gen de la distrofina humana, no se encontraron dos mujeres que tuvieran el mismo haplotipo. Los loci que resultaron ser más polimórficos en la población estudiada son el STR 44 y el STR 45, ambos con trece alelos y una frecuencia de heterocigocidad para STR 44 del 68.2% y para STR 45 del 77.3%. El locus menos polimórfico es el STR 50, con ocho alelos y una frecuencia de heterocigocidad del 54.5%. Comparando estos datos, con los encontrados en la población caucásica, tenemos que el locus reportado con mayor polimorfismo es el STR 49, con 19 alelos y una frecuencia de heterocigocidad del 93.3% y el alelo menos polimórfico es también STR 50 con 6 alelos y una frecuencia de heterocigocidad del 71% (Clemens *et al*, 1991). De acuerdo a los datos presentados en este trabajo, podemos señalar que la frecuencia de heterocigocidad de los marcadores STR de la población estudiada es adecuada para hacer análisis de ligamiento y detectar mujeres portadoras de la DMD/DMB en familias mexicanas afectadas con esta enfermedad. El alto grado de heterocigocidad de los loci STR, también incrementa la probabilidad de identificar el mosaicismo gonadal (Clemens *et al*, 1991).

Los tamaños de alelos encontrados en la población mexicana estudiada son: el menor de 156 pb (para el alelo localizado en el locus STR 45) y el mayor de 255 pb (para los alelos localizados en el locus STR 49), en tanto que los tamaños de los alelos reportados para la población caucásica son: el menor de 156 pb (para los alelos localizados en el locus STR 45) y el mayor de 257 pb (para los alelos ubicados en el locus STR 49)(Clemens *et al*, 1991).

En cuanto a las 2 familias analizadas en este trabajo, se pudo ampliar la información con

En cuanto a las 2 familias analizadas en este trabajo, se pudo ampliar la información con respecto a la extensión de la delección en el paciente 5D, con los marcadores STR, encontrándose que esta abarca a los intrones 49 y 50 del gen DMD. En este caso, como se detectó la delección, el diagnóstico de las hermanas es contundente ya que estas, heredaron el alelo materno sin delección, siendo por lo tanto no portadoras de la enfermedad. Para la familia 26 se tuvo que emplear el marcador localizado en el extremo 5' (DYS II-5') y el marcador localizado en el extremo 3' (DMD1c-2), ya que, no obstante que en el marcador STR 49 se encontró que las hermanas no son portadoras de la enfermedad, cabía la posibilidad de que se tratara de una recombinación meiótica. Sin embargo, el niño enfermo presenta la delección en los exones 46 y 47 (Coral, 1995) es decir, hacia el extremo 5' del marcador STR 49 y se encontró que precisamente los alelos del marcador DYS II-5' (ubicado en el extremo 5' del gen DMD) muestran que las hermanas no son portadoras de la enfermedad, descartando el evento recombinatorio. Con este resultado, ya no era relevante la información del extremo 3', es decir, los alelos del marcador DMD1c-2. De cualquier modo, estos alelos no fueron informativos, circunstancia que se ha presentado en todas las familias mexicanas estudiadas, posiblemente debido a un patrimonio genético distintivo de la población analizada (Coral, 1995 y Arenas, 1996).

Entre el 50-60% de los pacientes DMD/DMB presentan delecciones y aproximadamente un 8% duplicaciones, estos resultados se han obtenido mediante el empleo de sondas de DNA y cDNA del gen DMD en experimentos de hibridación tipo Southern (Worton y Thompson, 1988). Existen dos regiones denominadas "punto caliente menor", ubicada en los exones 1-11 y "punto caliente mayor", localizada en los exones 44-53, en donde se han

A los cuatro pacientes mexicanos afectados con DMD analizados en el presente trabajo, se les aplicó la técnica de PCR múltiple 9 y 5, la cual amplifica 14 exones diferentes del gen DMD, ubicados en las regiones en donde se ha encontrado la mayor frecuencia de deleciones (Koenig *et al*, 1987 y Forrest *et al*, 1987). Con esta metodología se detecta aproximadamente el 98% de las deleciones del gen DMD (Beggs *et al*, 1990 y Chamberlain *et al*, 1989). Una ventaja adicional del ensayo multiplex 9 y 5, es con respecto a la determinación de deleciones en el gen DMD con las hibridaciones tipo Southern, siendo éstas hibridaciones más lentas, con bandas de hibridación poco intensas en la autorradiografía y a precios más elevados (Koenig *et al*, 1989).

De los cuatro enfermos de DMD analizados en este trabajo, mediante PCR multiplex 5 y 9, al paciente identificado como 5D, se le detectó deleción de los exones 50, 51 y 52. También faltan los intrones 49 y 50, esto se determinó con la amplificación de los marcadores STR. Basándonos en estos datos y dado que si se amplificó el exón 48, la extensión de la deleción en este paciente, abarca desde el intrón 49 hasta el exón 52, en una de las regiones de mayor incidencia de mutaciones, el "punto caliente mayor". Faltaría establecer, si la deleción se extiende hasta el intrón 48 y el exón 49. Esta información podría obtenerse con el empleo de oligonucleótidos específicos para amplificar estas regiones (Coral, 1995). También faltaría determinar si la deleción continua más allá del exón 52.

## **CONCLUSIONES.**

**I. En la población mexicana la frecuencia de heterocigocidad calculada para los loci STR fue de: STR 44 (68.2%), STR 45 (77.3%), STR 49 (45.5%) y STR 50 (54.5%).**

**II. La frecuencia de heterocigocidad de los marcadores STRs en la población mexicana, permite el uso de estos marcadores intragénicos en el análisis de ligamiento para la detección de portadoras de la DMD/DMB.**

**III. Se estableció el diagnóstico molecular de posibles mujeres portadoras que pertenecen a familias con antecedentes de DMD/DMB, mediante la amplificación de los loci STR. Se encontraron 2 mujeres portadoras y 4 no portadoras de la enfermedad.**

**IV. En un paciente, se identificó una deleción en el punto caliente mayor del gen DMD, la cual abarca al menos del exón 50 al 52.**

**BIBLIOGRAFIA.**

**Abbs S, Yau SC, Clark S, Matthew CG, Bobrow M (1991).** A convenient multiplex PCR system for detection of dystrophin gene deletions: comparative analysis with cDNA hybridisation shows mistypings by both methods. *J Med Genet* **28**:304-311.

**Ahn AH, Kunkel LM (1993).** The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genetics* **3**:283-290.

**Appel S, Roses A (1983)** The muscular dystrophies. En Stanbury E. The metabolic basis of inherited disease. 5 ed. Mc Graw Hill.

**Arenas D (1996).** Estudio molecular de la distrofia muscular de Duchenne. Tesis doctoral. CINVESTAV-UNAM, Mex.

**Barkhaus P and Gilchirst J (1989).** Duchenne muscular dystrophy manifesting carriers. *Arch Neurol* **46**:673-675.

**Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM (1990).** Detection of 98% of DMD/DMB deletions by PCR. *Hum Genet* **86**:45-48.

**Beggs AH and Kunkel LM (1990).** A polymorphic CACA repeat in the 3' untranslated region of dystrophin. *Nucleic Acids Res* **18**:1931.

**Blake DJ, Tinsley JM, Davies KI (1994).** The emerging family of dystrophin related proteins. *Trends in Cell Biology* **4**:19-23.

**Burghes AHM, Logan C, Hu X, Belfall B, Worton RG, Ray PN (1987).** A cDNA clone from the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene. *Nature* **328**:434-437.

**Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs RA, De Andrade M, Chakraborty R, Caskey CT (1991). Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular Dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. Am J Hum Genet 49:951-960.**

**Coral R (1995). Estudio molecular de alteraciones en el gen DMD presentes en familias mexicanas con Distrofia muscular de Duchenne y Distrofia muscular de Becker. Tesis doctoral. CINVESTAV, Mex.**

**Chakraborty R, Zhong Y, De Andrade M, Clemens PR, Fenwick RG, Caskey CT (1994). Linkage disequilibria among (CA)<sub>n</sub> polymorphisms in the human dystrophin gene and their implications in carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophies. Genomics 21:657-570.**

**Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Nguyen PN, Caskey CT (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Res 16:11141-11156.**

**Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Caskey CT (1989). Multiple PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. En PCR protocols, a guide to methods and applications. Editado por Innis MA, Gelfand MA, Snisky JJ, White TJ. Academic Press pp. 272-281.**

**Darras BT, Francke U (1988). Normal human genomic restriction fragment patterns and polymorphisms revealed by hibridization with the entire Dystrophin cDNA. AM J Hum Genet 43:612-619.**

**Darras BT, Blattner JF, Harper AJ, Spiro AJ, Alter S, Francke U (1988). Intragenic**

deletions in 21 Duchenne muscular Dystrophy (DMD)/Becker muscular Dystrophy (BMD) families studied with the dystrophin cDNA: Location of breakpoints on HindIII and BglII exon containing fragment maps, meiotic and mitotic origin of the mutations. *Am J Hum Genet* 43:620-629.

Den dunnen JT, Bakker E, Van Ommen GJB, Pearson PL (1989). The DMD gene analysed by field inversion gel electrophoresis. *Br Med Bull* 45:644-658.

Engel AG, (1986). Duchenne Dystrophy. *En Miology*. ed. AG Engel y BQ Bamker NY Mc Graw Hill pp. 1185-1238.

Feener CA, Boyce FM, Kunkel LM (1991). Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA: Application to the 5' region of the dystrophin gene. *Hum Genet* 48:621-627.

Forrest SM, Cross GS, Speer A, Gardner-Medwin D, Burn J, Davies KE (1987). Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Nature* 329:638-640.

Gangopadhyay SB, Sherratt TG, Heckmatt JZ, Dubowitz, Miller G, Shokeir M, Ray PN, Strong PN, Worton RG (1992). Dystrophin in frameshift deletion patients with Becker muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 51:562-570.

Gutmann DH, Fischbeck KH (1989). Molecular Biology of Duchenne and Becker's muscular dystrophy: Clinical applications. *Ann Neurol* 26:189-194.

**Hammond RG Jr. (1987). Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of alpha-actinin. Cell 51:1.**

**Hodgson SV and Bobrow M (1989). Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy. Br Med Bull 45:719-744.**

**Hoffman EP, Brown RH Jr., Kunkel LM (1987). Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 51:919-928.**

**Hoffman EP, Hudecki MS, Rosenberg PA, Pollina C, Kunkel LM (1988). Cell and fiber type distribution of dystrophin. Neuron 1:411-420.**

**Hoffman EP, Watkins SC, Slayter HS, Kunkel LM (1989). Detection of a specific isoform of alpha-actinin with antisera directed against dystrophin. J cell Biol 108:503-510.**

**Hoffman EP and Schwartz L (1991). Dystrophin and Disease. Molec Aspects Med 12:175-194.**

**Hu X, Burghes AHM, Ray PN, Thompson MW, Murphy EG, Worton RG (1988). Partial gene duplication in Duchenne and Becker muscular dystrophies. J Med Genet 25:369-376.**

**Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary**



genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* **50**:509-517.

Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* **53**:219-228.

Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heidrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, Kaariainen H, de la Chapelle A, Kiuru A, Savontaus ML, Gilgenkrantz H, Récan D, Chelly J, Kaplan JC, Covone AE, Archidiacono N, Romeo G, Liechti-Gallati S, Schneider V, Braga S, Moser H, Darras BT, Wrogemann K, Blonden LAJ, van Paassen HMB, van Ommen GJB, Kunkel LM (1989). The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* **45**:498-506.

Kunkel LM, Hoffman EP (1989). Duchenne/Becker muscular dystrophy: A short overview of the gene, the protein, and current diagnostics. *Br med Bull* **45**:630-643.

Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nundel U (1992). A 71 Kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:5346-5350.

Lidov HGW, Selig S, Kunkel LM (1995). Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet* **4**:329-335.

Lindenbaum MH, Carbonetto S (1993). Dystrophin and patterns at the cell surface. *Curr Biol* **3**:109-111.

Love DR, Forrest SM, Smith TJ, England S, Flint T, Davies KE, Speer A (1989). Molecular analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Br Med Bull* **45**:659-680.

Mimura N, Asano A (1986). Isolation and characterization of a conserved actin-binding domain from rat hepatic actinogelin, rat skeletal muscle, and chicken gizzard alpha-actinins. *J Biol Chem* **261**:10680-10687.

Monaco AP y Kunkel LM (1989). Cloning of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. En *Advances in Human Genetics*, Eds. Harris HT y Hichorn K. Plenum Publishing NY **17**:61-98.

Oudet C, Heilig R, Mandel JL (1990) An informative polymorphism detectable by polymerase chain reaction at the 3' end of the dystrophin gene. *Hum Genet* **84**:283-285.

Oudet C, Heilig R, Hanauer A, Mandel JL (1991) Nonradioactive assay for new microsatellite polymorphisms at the 5' end of the Dystrophin gene, and estimation of intragenic recombination. *Am J Hum Genet* **49**:311-319.

Oudet C, Hanauer A, Clemens P, Caskey T, Mandel JL (1992). Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions. *Hum Mol Genet*

1:599-603.

**Passos-Bueno MR, Vainzof M, Marie SK, Zatz M (1994). Half the dystrophin gene is apparently enough for a mild clinical course: confirmation of its potential use for gene therapy. Hum Mol Genet 3:919-922.**

**Powell JF, Fodor FH, Cockburn DJ, Monaco AP, Craig IW (1991). A dinucleotide repeat polymorphism at the DMD locus. Nucleic Acids Res 19:1159.**

**Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR (1993). Exon structure of the human dystrophin gene. Genomics 16:536-538.**

**Schwartz LS, Tarlenton J, Popovich B, Seltzer WK, Hoffman EP (1992) Fluorescent multiplex linkage analysis and carrier detection for Duchenne/Becker muscular dystrophy. Am J Hum Genet 51:721-729.**

**Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M (1992). A second-generation linkage map of the human genome. Nature 359:794-801.**

**Weissenbach J (1993). Microsatellite polymorphisms and the genetic linkage map of the human genome. Curr Op Genet Develop 3:414-417.**

**Worton RG y Thompson M (1988). Genetics of Duchenne muscular dystrophy. Ann Rev**

**Genet 22:601-629.**